

# **Exhibit 19**

**IMMUNOPOTENTIATION AGENT**

**Publication number:** JP6298657

**Publication date:** 1994-10-25

**Inventor:** WATANABE TAKASHI

**Applicant:** NIPPON SHOJI KK

**Classification:**

**- International:** A61K35/74; A61P35/00; A61P37/04; A61K35/66;  
A61P35/00; A61P37/00; (IPC1-7): A61K35/74;  
A61K35/74

**- European:**

**Application number:** JP19930113682 19930415

**Priority number(s):** JP19930113682 19930415

**Report a data error here**

**Abstract of JP6298657**

**PURPOSE:**To obtain an immunopotentiation agent having enhancing action on resistance to MRSA infection and opportunistic infection and anti-malignant tumor action on sarcoma cell and L-1210 leukemia cell. **CONSTITUTION:**An immunopotentiation agent contains a cell of a bacterium belonging to the genus Actinobacillus, especially a live cell of Actinobacillus suis (ATCC15,557) or Actinobacillus actinomycetemcomitans (ATCC19,552) or a dead cell prepared by heat-treating the live cell as an active ingredient.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-298657

(43)公開日 平成6年(1994)10月25日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/74	ABD A	7431-4C		
	ADU C	7431-4C		

審査請求 未請求 請求項の数6 F D (全 9 頁)

(21)出願番号	特願平5-113682	(71)出願人	000231394 日本商事株式会社 大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号
(22)出願日	平成5年(1993)4月15日	(72)発明者	渡邊 隆司 三重県名張市桔梗が丘4-4-45
		(74)代理人	弁理士 細田 芳徳

(54)【発明の名称】 免疫強化剤

(57)【要約】

【構成】アクチノバチルス属に属する菌の菌体、特にアクチノバチルス スイス (ATCC 15557) またはアクチノバチルス アクチノマイセテムコミタンス (ATCC 29522) の生菌体または加熱処理された死菌体を有効成分として含有する免疫強化剤。

【効果】本発明のアクチノバチルス属に属する菌から調製された細菌製剤は、MRSA感染または日和見菌感染に対する抵抗性の増強作用、並びにザルコーマ細胞やL-1210白血病細胞に対する抗悪性腫瘍作用等を有する免疫強化剤を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アクチノバチルス属に属する菌の菌体を有効成分として含有する免疫強化剤。

【請求項2】 アクチノバチルス スイス (ATCC 15557) またはアクチノバチルス アクチノマイセテムコミタンス (ATCC 29522) の菌体を有効成分として含有する免疫強化剤。

【請求項3】 菌体が加熱処理された死菌体である請求項1または2記載の免疫強化剤。

【請求項4】 免疫強化がMRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) 感染症に対するものである請求項1〜3いずれか記載の免疫強化剤。

【請求項5】 免疫強化が日和見感染症に対するものである請求項1〜3いずれか記載の免疫強化剤。

【請求項6】 免疫強化が悪性腫瘍に対するものである請求項1〜3いずれか記載の免疫強化剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アクチノバチルス属 (Actinobacillus) に属する菌、中でもアクチノバチルス スイス (Actinobacillus suis) ATCC 15557株またはアクチノバチルス アクチノマイセテムコミタンス (A. actinomycetemcomitans) ATCC 29522株の菌体を有効成分として含有するMRSA感染症、日和見感染症および悪性腫瘍に対する免疫強化剤に係るものである。

## 【0002】

【従来の技術】 重度の熱傷、癌あるいはステロイド剤の長期・大量投与などで惹起される免疫系諸機能の減弱あるいは低下の結果、宿主は易感染状態となり、重篤な日和見感染症に陥り、死に至る症例が多いことは周知のところである。一方、種々の悪性腫瘍に対する免疫・化学療法剤に関する研究開発も盛んにおこなわれている。これら成果の中には、細菌菌体またはその抽出物を用いた免疫強化剤あるいは抗腫瘍剤がある。例えば、①特公昭43-6690号公報に記載されているA群溶血性連鎖球菌 (ストレプトコッカス ピオゲネス) Su株の生菌菌体 (以下、溶連菌製剤という) を用いた方法、②黄色ブドウ球菌の菌体成分を用いた特公昭59-46487号公報の方法、③緑膿菌菌体成分を用いた特公昭61-23167号公報の方法、④乳酸桿菌の1菌株であるラクトバチルスカゼイ菌 YIT-9018株の菌体 (以下、LC-9018製剤という) を用いた特公昭62-34727号公報の方法、あるいは⑤非定型抗酸菌の菌体抽出物を用いた特公昭62-41214号公報の方法などが、その例として挙げられる。ところで、このような細菌性製剤をはじめとする、いわゆる外来性生体応答調節物質は宿主免疫系の諸機能を非特異的に活性化する免疫薬理学的作用を有することは、多数の報告よりすでに明らかにされているところである。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 細菌製剤を免疫強化剤あるいは抗腫瘍剤として用いる場合、ヒトに対して病原性を示さない菌種が好ましく、またヒトの常在菌として共生し、ヒトに有益な菌も望ましい菌種といえるであろう。この観点から、溶連菌、緑膿菌あるいは抗酸菌などは、その製剤が生菌体の場合は勿論のこと、たとえ死菌体であっても、元来ヒトに対して病原性を示す菌種であるという点で問題が残る。また菌体抽出物を有効成分として利用する場合には、製造上、抽出、分離、単離、精製などの複雑な処理工程を必要とする問題点がある。他方、常在性非病原性菌の菌体そのものを用いる場合、その投与量あるいは投与期間によっては免疫担当細胞群の豊富な臓器や造血臓器・器官などに対する2次的な副作用の生じる可能性が考えられる (Sato K., Infect. Immun., 44, 445, 1984)。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上述のような現状と問題点を背景に、①菌体そのものが免疫系諸機能の強力な増強能を有し、②臓器毒性が極めて低く③ヒトに対しては病原性がなく、しかも④生菌体であることを必要としない細菌属の探索を鋭意進めた結果、アクチノバチルス属に属する菌、中でもアクチノバチルス スイス種の1菌株であるATCC 15557株およびアクチノバチルス アクチノマイセテムコミタンス種の1菌株であるATCC 29522株が、前記の条件に適合する菌種であることを見出し、さらに研究を進めて本発明を完成した。

【0005】 すなわち、本発明の要旨は、(1) アクチノバチルス属に属する菌の菌体を有効成分として含有する免疫強化剤、(2) アクチノバチルス スイス (ATCC 15557) またはアクチノバチルス アクチノマイセテムコミタンス (ATCC 29522) の菌体を有効成分として含有する免疫強化剤、(3) 菌体が加熱処理された死菌体である前記(1)または(2)記載の免疫強化剤、(4) 免疫強化がMRSA感染症に対するものである前記(1)〜(3)いずれか記載の免疫強化剤、(5) 免疫強化が日和見感染症に対するものである前記(1)〜(3)いずれか記載の免疫強化剤、(6) 免疫強化が悪性腫瘍に対するものである前記(1)〜(3)いずれか記載の免疫強化剤に関する。

【0006】 本発明に用いられるアクチノバチルス属に属する菌はグラム陰性の通性嫌気性桿菌で、分類学上はバクテリヤ科に属する (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984)。アクチノバチルス属に属する菌はヒトを含む哺乳動物に寄生性があり、形状は球形が優勢であるが、桿状や糸状を呈することもある。アクチノバチルス スイス菌の豚、馬や牛に対する感染症例報告は、これまでに数編みられるものの、ヒトへの感染や病原性に関する報告は、現在までのところ皆無である。ア

クチノバチルス属に属する菌株は、ATCCや工業技術院生命工学工業技術研究所等の菌株保存センターから入手することができる。本発明に特に有利に用いられるアクチノバチルス スイス菌およびアクチノバチルス アクチノマイセテムコミタンス菌もATCCから入手することができ、例えばアクチノバチルス スイスATCC 15557株およびアクチノバチルスアクチノマイセテムコミタンスATCC29522株を例示することができる。

【0007】本発明に用いられるアクチノバチルス属に属する菌の菌体は、生菌体でも死菌体でもよく、次のようにして調製することができる。まず、ブレインハートインフュージョン培地（仔牛脳浸出液20%、牛心臓浸出液25%、ペプトン1%、グルコース0.5%、塩化ナトリウム0.5%、リン酸水素二ナトリウム0.25%、pH7.4）1000mlを2.5リットル容フラスコに分注し、121℃で15分間滅菌した後、予め前培養しておいた種用培養液を接種する。ついで、37℃で18~24時間静置培養した後、遠心分離により培養液から菌体を集め、生理的食塩水で2回洗浄する。なお、アクチノバチルス属に属する菌の培養用の培地としては、ブレインハートインフュージョン培地の代わりに、グルコース（0.5%）、リン酸塩（0.5%）、ペプトン（0.5%）、酵母エキス（1%）を含む培地（pH7.4）を用いることもできる。アクチノバチルス アクチノマイセテムコミタンス等のように培養時にCO<sub>2</sub>ガスの供給により菌の増殖を促進できる場合もある。この場合のCO<sub>2</sub>ガス濃度は、通常5%である。

【0008】こうして得られた湿菌体を滅菌蒸留水に懸濁し、そのまま凍結乾燥すると粉末状の生菌体が得られる。また、上記湿菌体の滅菌蒸留水懸濁液を80℃の湯浴中で60分間加熱処理した後、凍結乾燥して死菌体粉末を得ることができる。別法として、湿菌体を121℃で20分間加熱滅菌した後、80℃の熱風で乾燥して死菌体粉末とすることもできる。これらの菌体粉末はバイアル瓶やアンプルに無菌的に真空封入して冷蔵保存する。

【0009】本発明に用いるアクチノバチルス スイスATCC15557株およびアクチノバチルス アクチノマイセテムコミタンスATCC29522株の生菌体、死菌体の調製も、上述したアクチノバチルス属に属する菌一般の菌体調製法に従って行なうことができる。

【0010】本発明の免疫強化剤は、上述のようにして調製した菌体を有効成分として含有するものであり、後述の実施例において詳述するように、MRSA感染、日和見感染、悪性腫瘍等に対する防御機構である免疫系機能を増強させることができる優れた作用を有している。その一方、本発明の免疫強化剤は毒性が低く、急性毒性値(LD<sub>50</sub>)は、極めて大きいことが特長といえる。本発明の免疫強化剤は、菌体粉末を滅菌した生理食塩水、

リンゲル液等に懸濁した液剤として、あるいは通常用いられる適当な基剤を利用して坐剤、顆粒剤、錠剤または軟膏剤として調製される。この場合、他の化学療法剤やステロイド等の免疫抑制剤を配合した製剤の調製も可能である。

【0011】本発明の免疫強化剤の投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、経口投与あるいは注腸内投与のいずれを選択することもできる。免疫強化剤の投与量は、投与方法によって異なるが、粉末菌体量として、成人1日あたり、静脈内投与で30~150mg/kg、皮下投与で500~2000mg/kg、腹腔内投与で5~20mg/kg、経口投与で1000~4000mg/kg、注腸内投与では500~2000mg/kg程度であり、1日1~3回に分け、5~10日間投与するのが好ましい。なお、これらの投与量は、年令・症状などによってはこれらの範囲外となってもよい。

#### 【0012】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなら限定されるものではない。

#### 【0013】実施例1

本発明に用いられるアクチノバチルス スイスATCC15557株の生菌体粉末及び死菌体粉末（以下、As-15557製剤という）は次のようにして調製した。培養液1000ml中に、仔牛脳浸出液200g、牛心臓浸出液250g、ペプトン10g、グルコース5g、塩化ナトリウム5g、リン酸水素二ナトリウム2.5gを含有するpH7.4の培地（一般名：ブレインハートインフュージョン培地）を121℃で15分間滅菌した後、予め前培養した種用菌液を適当量接種した。37℃で18~24時間静置培養した後、培養菌液から菌体を遠心分離し、生理的食塩水で2回洗浄した。洗浄後、滅菌蒸留水による菌体懸濁液を作製し、そのまま（生菌体の場合）または80℃の湯浴中で60分間加熱処理し（死菌体の場合）、凍結乾燥し粉末化した。菌体はクリーム様黄色を呈した。なお、0.5mg/mlの菌浮遊液の吸光度は540nmにて測定した場合、1.5を示した。

#### 【0014】実施例2

アクチノバチルス アクチノマイセテムコミタンスATCC29522株の生菌体および死菌体（以下、Aa-29522製剤という）の調製方法も実施例1に記載した方法と全く同様である。なお、菌体粉末は白色を呈した。一方、比較対照用の他種細菌製剤（3菌種）のうち、ストレプトコッカス サーマフィルスIFO3535株の菌体（以下、St-3535製剤という）は実施例1に記載の方法と同じ方法で調製し、LC-9018製剤は加藤らの方法（Kato, I. et al: Gann, 72: 517, 1981）に準じて調製し、市販溶連菌製剤は中外製薬社

製のものを使用した。

### 【0015】実施例3

日和見菌感染に対する抵抗性の増強作用

緑膿菌感染およびカンジダ菌感染に対する抵抗性の増強能

ddY系雌マウス（5週令、体重25g前後）を1群10匹宛用い、マウス1匹あたり供試5菌種細菌製剤（As-15557, Aa-29522, LC-9018, 市販溶連菌, St-3535）の各々0.1mg（生理的食塩水1ml中に0.5mgの菌体を含む菌液0.2ml: 4mg/kg）または0.5mg（生理的食塩水1ml中に2.5mgの菌体を含む菌液0.2ml）を腹腔内投与し、その3日後にマウス1匹あたり患者喀痰より分離培養した緑膿菌MNCC4709株の $1.8 \times 10^7$  生菌単位（CFU）、または患者尿由来のカンジダアルビカンス（*C. albicans*）MNCC4105株の $1.3 \times 10^8$  CFU（St-3535製剤を除く4菌種製剤を供試）を腹腔内感染させた。感染後10日間に亘り、動物の死亡数を記録し、10日目の生存率を求めた（生存とは、無処理のマウスと同程度に自然死するまで）。

諸種細菌製剤の緑膿菌またはカンジダ感染に対する宿主抵抗性増強作用

細菌製剤投与群	投与量	生存率（％）	
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
非投与対照群	——	0	0
As-15557 投与群	4mg/kg 20mg/kg	90 ** 100 **	80 ** 90 **
Aa-29522 投与群	4mg/kg 20mg/kg	60 * 80 **	70 * 90 **
LC-9018	4mg/kg 20mg/kg	40 70 *	50 80 **
市販溶連菌	4mg/kg 20mg/kg	20 70 *	40 60 *
St-3535	20mg/kg	10	——

（注）\* 危険率5％以下、\*\*危険率1％以下で有意差あり  
（Student t-テスト法）

### 【0018】実施例4

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）感染に対する抵抗性の増強能

ddY系雌マウス（5週令）を1群10匹宛用い、実施例3と同様の方法でマウス1匹あたり供試細菌製剤（4菌種）を腹腔内投与し、その3日後にマウス1匹あたり、患者喀痰由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）MNCC4810株（ $4.4 \times 10^7$  CFU/マウス）を腹腔内感染させた。感染後10日間に亘り、動物の死亡数を記録し、10日目の生存率を求めた。その

\*で生存し続けることを意味する）。一方、非投与対照群にはマウス1匹あたり、生理的食塩水0.2mlを腹腔内投与し、同量の緑膿菌またはカンジダ アルビカンスで攻撃した。なお、10日目以降に生き残った動物は、さらに1ヵ月間飼育したが、生死数の変動は感染後5日目迄であり、1ヵ月間におけるその後の変動は皆無であった。各群における生存率を表1に示す。

【0016】供試5菌種細菌製剤のうち、アクチノパチルス属に属する菌の2菌種の製剤（As-15557製剤とAa-29522製剤）の緑膿菌感染およびカンジダ菌感染に対する抵抗性の増強能は、いずれの投与量においてもLC-9018製剤や市販溶連菌製剤のそれよりも強く、中でもAs-15557製剤においては4mg/kg（0.1mg/マウス）の投与量でも80～90％の生存率を示した。これに対し、市販溶連菌製剤と同属に属する菌のSt-3535製剤には、緑膿菌に対する感染抵抗性の増強能は殆どみられなかった。

### 【0017】

【表1】

結果を表2に示す（なお、供試4菌種細菌製剤とは、As-15557製剤、Aa-29522製剤、LC-9018製剤および市販溶連菌製剤のことである）。As-15557製剤およびAa-29522製剤のMRSA菌感染に対する抵抗性の増強能は、表2に示すように、LC-9018製剤あるいは市販溶連菌製剤のそれよりも強く、中でもAs-15557製剤の感染抵抗性の増強能は極めてすぐれていた。

### 【0019】

【表2】

諸種細菌製剤のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)  
感染に対する宿主抵抗性増強作用

細菌製剤	投与量	生残率(%)
		メチシリン耐性黄色ブドウ球菌
非投与対照群	—	0
As-15557 投与群	4mg/kg(0.1mg/マウス) 20mg/kg(0.5mg/マウス)	60 * 90 **
Aa-29522 投与群	4mg/kg(0.1mg/マウス) 20mg/kg(0.5mg/マウス)	60 * 80 **
LC-9018 投与群	4mg/kg(0.1mg/マウス) 20mg/kg(0.5mg/マウス)	30 70 *
市販溶連菌 投与群	4mg/kg(0.1mg/マウス) 20mg/kg(0.5mg/マウス)	20 40

(注) \* 危険率5%以下、\*\*危険率1%以下で有意差あり  
(Student t-テスト法)

#### 【0020】実施例5

デキサメサゾン処置免疫減弱動物における緑膿菌感染抵抗性の増強能

ddY系雌マウス(5週令)を1群10匹宛用い、緑膿菌感染5日前よりマウス1匹あたり副腎皮質ホルモン剤であるデキサメサゾン(品名:デカドロン、日本メルク社)0.2ml(生理的食塩水1ml中に1mg含む)を3日間に亘り1日1回腹腔内投与した。さらに感染3日前に供試4菌種の細菌製剤をマウス1匹あたり4mg/kgまたは20mg/kgの腹腔内投与を行い、その投与3日後に非処置正常対照群の生残率が20~30%になるように緑膿菌MNCC4709株( $6.2 \times 10^5$  CFU/マウス)を腹腔内感染させた後、10日目の生残率を求めた。その結果を図1に示す(なお供試4菌種細菌製剤とは、As-15557製剤、Aa-29522製剤、LC-9018製剤および市販溶連菌製剤を意味する)。

【0021】デキサメサゾンで処置した細菌製剤非投与対照群のマウスは、緑膿菌感染により全例死亡したのに対し、4種の供試細菌製剤(20mg/kg, 0.5mg/kg/マウス)をデキサメサゾン処置マウスに投与することにより、非処置正常対照群における生残率(20%)よりも高い生残率を示し、中でもAs-15557製剤投与群の生残率は80%と最も高率であった。また4mg/kgの供試細菌製剤を投与した場合の感染抵抗性増強能はAs-15557製剤(60%)、Aa-29522製剤(30%)、LC-9018製剤(20%)、市販溶連菌製剤(10%)の順であった。

#### 【0022】実施例6

デキサメサゾン処置マウス腹腔マクロファージにおける緑膿菌殺菌能の増強

実施例5で示されたデキサメサゾン処置免疫減弱マウスにおける供試細菌製剤の緑膿菌感染抵抗性の増強作用

が、デキサメサゾンによって低下した免疫系機能の活性化に起因しているか否かを調べるために、腹腔マクロファージの緑膿菌殺菌能が供試細菌製剤により増強されたか否かについて検討した。

【0023】ddY系雌マウス(5週令)1群あたり3匹を用い、実施例5と同じ条件でデキサメサゾンによる処置および供試3菌種細菌製剤4mg/kg(0.1mg/kg/マウス)の腹腔内投与を行った。その3日後にデキサメサゾン非処置正常群およびデキサメサゾン処置対照群と共に緑膿菌MNCC4709株( $1 \times 10^5$  CFU/マウス)を腹腔内感染させた。感染直後および3時間後にヘパリン(4単位/ml)添加ハanks緩衝液2.5mlで動物腹腔内を2回洗浄し、採取された腹腔洗浄液(5ml)を遠心分離し、得られた遠心上清および遠心沈澱細胞に0.83%塩化アンモニウム液(5ml)を添加した後、緑膿菌生菌単位(CFU)を緑膿菌選択用寒天培地を用いて各々算定し、上清中のCFUと細胞内CFUの和をもって腹腔内の感染菌の全CFUとし、下記の式により腹腔マクロファージの緑膿菌殺菌能の増強率(%)を求めた。

殺菌能増強率(%) =  $\{[(\text{感染直後のCFU}) - (\text{感染3時間後のCFU})] / \text{感染直後のCFU}\} \times 100$

【0024】その結果を図2に示す(なお、供試3菌種細菌製剤は、As-15557製剤、LC-9018製剤および市販溶連菌製剤である)。マウス腹腔マクロファージの緑膿菌殺菌能は、デキサメサゾンで処置することにより非処置正常群のそれよりも著しく減弱された。しかし、供試いずれかの細菌製剤の投与により、減弱した腹腔マクロファージ殺菌能の明らかな回復と機能亢進がみられた。中でも本発明のAs-15557製剤投与群における腹腔マクロファージの機能亢進は極めて顕著であった。このことは、マクロファージの機能亢進の結果、サイトカインネットワークなどの免疫系が作動する

ことにより、図1で示された成績が得られたことを強く示唆した。

#### 【0025】実施例7

緑膿菌感染に対する抵抗性の増強作用における有効量  
ddY系雌マウス（5週令）を1群10匹宛用い、マウス1匹あたりAs-15557製剤またはLC-9018製剤の0.4mg/kg、2mg/kg、4mg/kg、8mg/kg、20mg/kgまたは40mg/kgを腹腔内投与し、その3日後に緑膿菌MNCC4709株（ $1.8 \times 10^7$  CFU/マウス）を用いて腹腔内攻撃した後、10日目の生残率を求めた。その結果を表3に示す。

#### 【0026】

#### 【表3】

As-15557およびLC-9018 製剤の緑膿菌感染  
抵抗性増強作用における有効量

投与量 (mg/kg)	生残率 (%)	
	As-15557投与群	LC-9018 投与群
0	0	0
0.4	40	10
2.0	60 *	20
4.0	60 *	40
8.0	70 *	60 *
20.0	90 **	70 *
40.0	100 **	80 **

(注) \* 危険率5%以下、\*\*危険率1%以下で  
有意差あり (Student t-テスト法)

【0027】5%危険率 (Student t-テスト法) より、  
各々の細菌製剤の最小有効量を求めたところ、LC-9018製剤のそれは8mg/kg (0.2mg/kg) であった。これに対し、本発明のAs-15557製剤の最小有効量は2mg/kg (0.05mg/マウス) であった。

#### 【0028】実施例8

緑膿菌感染に対する抵抗性増強作用の持続効果

\*

供試細菌製剤の緑膿菌感染マウスにおける感染症発症遅延作用

細菌製剤	投与量 (mg/kg)	相対生存値	平均生存期間 ±S.D. (時間)
非投与対照群	0	1.00	17.4 ± 5.7
As-15557投与群	20	2.14**	37.2 ± 11.3
LC-9018 投与群	20	1.72*	30.0 ± 8.9
市販溶連菌製剤 投与群	20	1.28	22.2 ± 7.6

(注) \* 危険率5%以下、\*\*危険率1%以下で有意差あり  
(Student t-テスト法)

【0032】いずれの投与群においても全動物は死亡したものの、As-15557製剤およびLC-9018製剤は有意性のある生存時間の延長、即ち延命効果を示したが、危険率からみると、本発明のAs-15557製剤の緑膿菌感染症発症遅延作用はLC-9018製剤

\* ddY系雌マウス（5週令）を1群10匹宛用い、緑膿菌感染21日前、14日前、10日前、7日前あるいは3日前に、マウス1匹あたり供試細菌製剤 (As-15557製剤またはLC-9018製剤) の2mg/kgを腹腔内投与した後、緑膿菌MNCC4709株 ( $1.8 \times 10^7$  CFU/マウス) で腹腔内攻撃し、10日目の生残率を求めた。

【0029】その結果、供試細菌製剤を1回のみ投与した場合の緑膿菌感染に対する抵抗性は、日数の経過に伴って低下 (即ち生残率は低下) するものの、As-15557製剤の投与10日目における生残率は60%であり、非投与対照群 (感染後2日までに全動物死亡: 生残率0%) との間に有意差 (危険率5%以下) がみられたが、LC-9018製剤の生残率に有意性がみられたのは投与3日目 (生残率: 70%) のみであった。これらの結果から、本発明のAs-15557製剤の2mg/kg、1回投与における感染抵抗性増強の持続期間は少なくとも10日間であり、LC-9018製剤の3日間に比べて、その効果が極めて長期間持続することが示された。

#### 【0030】実施例9

緑膿菌感染マウスにおける感染症発症遅延作用

ddY系雌マウス（5週令）を1群10匹宛用い、マウス1匹あたり緑膿菌MNCC4709株 ( $1 \times 10^7$  CFU/マウス) を腹腔内感染させた後、その3時間後に供試3菌種製剤 (As-15557製剤、LC-9018製剤または市販溶連菌製剤) の20mg/kgを腹腔内投与した。感染後6時間毎に各群の動物が死亡するまでに要した時間 (即ち、生存時間) を記録し、これら細菌製剤の緑膿菌感染症発症遅延効果の有無について調べた (Student t-テスト法)。その結果を表4に示す。

#### 【0031】

#### 【表4】

のそれよりもすぐれていることが認められた。一方、市販溶連菌製剤にはほとんど延命効果は認められなかった。

#### 【0033】実施例10

ザルコーマ180癌細胞移植実験系における抗腫瘍作用



本試験は3つの系で行なった。即ち①ICR系雌マウス（5週令、体重25g前後）を1群10匹宛用い、担癌3日前より、マウス1匹あたりAs-15557製剤8mg/kg（0.2mg/マウス）を3日間に亘り1日1回計3回（総投与量：24mg/kg）、12mg/kg（0.3mg/マウス）のものを2日間に亘り1日1回計2回（総投与量：24mg/kg）または24mg/kg（0.6mg/マウス）のものを移植3日目に1回（総投与量24mg/kg）腹腔内投与した後、ザルコーマ180癌細胞（ $1 \times 10^6$  コ/マウス）を腹腔内移植した系、②マウス1匹あたり $1 \times 10^6$  コの癌細胞を腹腔内移植した後、As-15557製剤8mg/kgを3日間に亘り1日1回計3回（総投与量：24mg/kg）、12mg/kgのものを2日間に亘り1日1回計2回（総投与量：24mg/kg）または24mg/kgのものを移植3日目に1回（総投与量：24mg/kg）腹腔内投与した系、③As-15557製剤4mg/kg（0.1mg/マウス）を癌細胞の腹腔内移植（ $1 \times 10^6$  コ/マウス）前後6日間に亘り1日1回計6回（総投与量：24mg/kg）腹腔内投与した系、でおこない移植後8週間に亘り、腫瘍死した動物の匹数を記録し、8週目の生残率を求めた。なお、ザルコーマ180癌細胞移植対照群は生理的食塩水を腹腔内投与した。その結果を表5に示す。

【0034】

【表5】

As-15557製剤のザルコーマ180 癌細胞移植に対する抗腫瘍作用

実験群	総投与量 (mg/kg)	生残率 (%)
ザルコーマ180細胞 単独移植対照群	0	0
移植前投与群 8mg/kg × 3回 12mg/kg × 2回 24mg/kg × 1回	24 24 24	40 30 40
移植後投与群 8mg/kg × 3回 12mg/kg × 2回 24mg/kg × 1回	24 24 24	10 30 10
移植前後投与群 4mg/kg × 6回	24	50*

(注) \* 危険率5%以下で有意差あり  
(Student t-テスト法)

【0035】ザルコーマ180癌細胞移植前および後あるいは前後通じてAs-15557製剤を投与（総投与量：24mg/kg）した場合、その投与方法により動物の生残率は異なるもののかなりの生残率を示したことから、本発明のAs-15557製剤はザルコーマ180癌移植（腹腔内）に対して抗腫瘍活性を有するものと思われる。表5に見られるように、As-15557製剤の場合、癌細胞移植前、後あるいは前後通じての生残率（移植前投与平均生残率：36.7%，移植後投与平均生残率：16.7%，移植前および後投与生残率：50%）は、免疫強化剤（生体免疫応答物質）の有する作用機序から考えて極めて信頼性の高い結果であるといえる。

【0036】実施例11

L-1210白血病細胞移植実験系における抗腫瘍作用  
実験系は実施例10と同様の系を用いた。即ち、①DBA/2Cr系雌マウス（5週令、体重18g前後）を1群10匹宛を用い、担癌3日前より、マウス1匹あたりAs-15557製剤11.1mg/kg（0.2mg/マウス）を3日間に亘り1日1回計3回（総投与量：33.3mg/kg）あるいは33.3mg/kg（0.6mg/マウス）のものを移植3日目に1回（総投与量：33.3mg/kg）腹腔内投与した後、L-1210白血病細胞（ $4 \times 10^6$  コ/マウス）を腹腔内移植した系、②マウス1匹あたり、 $4 \times 10^6$  コの癌細胞を腹腔内移植した後、As-15557製剤11.1mg/kgを3日間に亘り1日1回計3回（総投与量：33.3mg/kg）腹腔内投与した系、③As-15557製剤5.55mg/kg（0.1mg/マウス）を癌細胞の腹腔内移植（ $1 \times 10^6$  /マウス）前後6日間に亘り1日1回計6回（総投与量：33.3mg/kg）腹腔内投与した系、でおこない、移植後、動物が腫瘍死するまでの日数を観察し、生理的食塩水のみを投与したL-1210白血病細胞移植対照群の平均生存日数を1とした場合のAs-15557製剤投与群における相対生存値並びに平均生存日数を算定した。その結果を表6に示す。

【0037】

【表6】

## As-15557製剤のL-1210白血病細胞移植に対する抗腫瘍作用

実験群	総投与量 (mg/kg)	相対生存値	平均生存期間 ±S.D. (日)
L-1210白血病細胞 単独移植対照群	0	1.000	9.6 ± 1.3
移植前投与群 11.1mg/kg × 3回 33.3mg/kg × 1回	33.3 33.3	1.354 ** 1.250 *	13.0 ± 2.8 12.0 ± 1.8
移植後投与群 11.1mg/kg × 3回	33.3	1.146	11.0 ± 1.7
移植前後投与群 5.55mg/kg × 6回	33.3	1.448 **	13.9 ± 3.2

(注) \* 危険率5%以下、\*\*危険率1%以下で有意差あり  
(Student t-テスト法)

【0038】L-1210白血病細胞移植前および後あるいは前後通じてAs-15557製剤を投与(総投与量:33.3mg/kg)した場合、その投与方法により動物の平均生存期間は異なるものの、対照群の生存時間を1として算出した相対生存値(移植前および後あるいは前後通じての相対生存値は各々1.30、1.15あるいは1.45である)に有意差がみられたことから、免疫強化剤の作用機序とL-1210白血病細胞の性状から考えても極めて信頼性の高い結果であり、本発明のAs-15557製剤は強力な増殖能を有するL-1210白血病細胞(腹腔内移植)に対しても、抗腫瘍\*

\*活性を有するものと思われる。

## 【0039】実施例12

As-15557製剤の毒性試験

(1) 供試細菌製剤の急性毒性試験(LD<sub>50</sub>)

ddY系雌マウスおよび雄マウス(5週令)を1群5匹宛用い、供試3菌種製剤(2倍階段希釈)の急性毒性(LD<sub>50</sub>)について、Litchfield-Wilcoxon法に従って求めた。その結果を表7に示す。

【0040】

【表7】

諸種細菌製剤のマウスに対するLD<sub>50</sub>

投与方法	細菌製剤	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	
		雌	雄
腹腔内	As-15557	812	707
	LC-9018	561	—
	市販溶連菌	141	—
静脈内	As-15557	200	177
	LC-9018	177	—
	市販溶連菌	31	—
皮下	As-15557	3000以上	3000以上
経口	As-15557	5000以上	5000以上

【0041】As-15557製剤の雌マウスに対するLD<sub>50</sub>は、腹腔内および静脈内投与においてLC-9018製剤および市販溶連菌製剤のそれらよりも1.1~6.5倍高い値を示し、急性毒性は極めて低いことが明らかとなった。またAs-15557製剤の腹腔内および静脈内投与において雄マウスよりも雌マウスに対して相対的に高いLD<sub>50</sub>値を示し、皮下あるいは経口投与でのLD<sub>50</sub>値は3000mg/kg以上であった。

【0042】(2) 本発明の細菌製剤投与マウスの肝臓

および脾臓組織における病理組織学的所見

As-15557製剤の20mg/kgをマウス尾静脈内に投与した後、10日目に全動物を麻酔、屠殺した。肝臓および脾臓を摘出し、ホルマリン固定した後、パラフィン包埋組織切片標本を作製し、光学顕微鏡下でこれら標本における病理組織学的病変について観察した。その結果、肝臓組織切片像において、非投与群のそれらと比較して極めて微弱な肝細胞壊死や顆粒球の類洞への浸潤がみられるものの、明らかな病変所見像は、ほとん

どみられなかった。また、脾臓組織標本の赤脾髄所見および白脾髄所見においては非投与対照群と比べて異常はみられなかった。

#### 【0043】 (3) 抗原性試験

ddY系雌マウス(5週令)を1群3匹宛用い、マウス1匹あたりAs-15557製剤、160mg/kg(4mg/マウス)を腹腔内あるいは静脈内に1回のみ投与した後、14日目および21日目に血清を分離採取し、血清中の抗As-15557抗体産生の有無についてAs-15557菌体に対する凝集試験およびAs-15557菌体の超音波処理破壊(200W, 30分間)菌上清液に対する沈降試験および免疫電気泳動法で調べた結果、いずれの投与群由来血清においても陰性であり、抗体の産生は認められなかった。

10

#### 【0044】

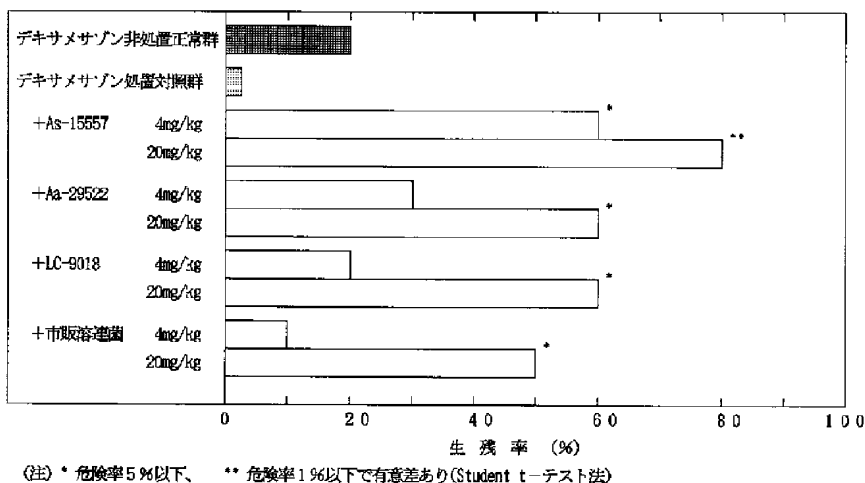
【発明の効果】本発明のアクチノバチルス属に属する菌から調製された細菌製剤は、MRSA感染または日和見菌感染に対する抵抗性の増強作用、並びにザルコーマ細胞やL-1210白血病細胞に対する抗悪性腫瘍作用等を有する免疫強化剤を提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、デキサメサゾン処置免疫減弱マウスの緑膿菌感染抵抗性に対する各種細菌製剤の増強作用を示す図である。

【図2】図2は、デキサメサゾン処置マウスの腹腔マクロファージの緑膿菌殺菌能に対する各種細菌製剤の増強作用を示す図である。

【図1】



【図2】

